

Die Nucleotide im Blute bei Harnsäuregicht und primär chronischer Polyarthrit

Von J. SCHMID

Privatdozent an der Universität Wien

(Eingegangen am 24. Juni 1964)

Untersuchungen des Vollblutes mit Dowex-1-Formiat-Säulen an 18 Normalfällen, 16 Patienten mit primär chronischer Polyarthrit und 12 Patienten mit Harnsäuregicht ergaben außer dem qualitativen Nachweis geringer Mengen einiger beim Menschen bisher nicht beschriebener Purin- und Pyrimidinderivate bei den Polyarthritikern signifikante Vermehrungen der Adenosinphosphate und von GTP. Die Gichtkranken wiesen nur eine Erhöhung der Harnsäure-Konzentration auf. Es konnte kein Anhaltspunkt für das Vorliegen größerer Mengen von Harnsäureribosid bei ihnen erhalten werden.

Whole blood from 18 normal people, 16 patients with primary chronic polyarthrit and 12 patients with gout was fractionated on columns of Dowex-1-formiate. Small amounts of some purine and pyrimidine derivatives not hitherto described for humans were demonstrated qualitatively and significant increases in the levels of adenosine triphosphate and guanosine triphosphate were found in patients with polyarthrit. In patients with gout, there was only an increase in uric acid; there was no evidence for the presence of increased amounts of uric acid riboside.

Die bisherigen Ergebnisse über den Gehalt des normalen menschlichen Vollblutes an Harnsäure und Nucleotiden veranlaßten mich nach Abweichungen bei rheumatischen Erkrankungen zu suchen, zumal die von BISHOP und Mitarbeitern (1) eingeführte Methode zu gut reproduzierbaren Werten führt und vor ihnen nur einzelne Nucleotide im Blut (2, 3) oder ihre relativen Mengenverhältnisse untersucht wurden (4, 5).

Die *Harnsäurekonzentration* könnte vor allem durch Hypoxanthin, dem als Hemmer des Harnsäuretransportes im menschlichen Erythrocyten große Bedeutung beigemessen wird, beeinflußt werden. Möglicherweise läßt sich das unterschiedliche Verhalten des Harnsäurequotienten Erythrocyten/Plasma durch Schwankungen des Hypoxanthins im Blute erklären, das ja als Abbauprodukt der wichtigen Inosinsäure ständig in Spuren vorhanden ist und den Influx der Harnsäure in den Erythrocyten stärker hemmt als den Efflux (6), der eine Teilkomponente besitzt, die nur bis zu einer bestimmten Hypoxanthinkonzentration einflußbar ist (7). Schließlich böte das Harnsäureribosid — wenn es beim Menschen existierte — eine leichte Erklärung für die Gichtanfälle (8—14).

Außer Harnsäure schien auch das Verhalten der *Purinbasen* und *Nucleotide* in den Blutkörperchen insofern interessant, als PREISS und HANDLER (15) in menschlichen Erythrocyten eine Nucleotidpyrophosphorylase fanden, die Adenin, Hypoxanthin und Guanin zu ihren entsprechenden Nucleotiden verwandeln kann und von 1960 an Untersuchungen erschienen, wo an den Kaninchenerythrocyten (16, 17, 18, 19) und im menschlichen Blut (6, 20) Möglichkeiten der Nucleotidbildung aufgezeigt werden. — Das häufige Auftreten schwer einflußbarer Anämien bei der primär chronischen Polyarthrit und Harnsäuregicht (21—26) mit Erniedrigung der Serumeisenwerte (27—33) und Störung der erythropetischen Knochenmarksfunktion, die mit der Existenz eines hämolytischen Faktors verbunden sein dürfte (34—39) läßt die Möglichkeit offen, daß gewisse rheumatische Erkrankungen mit Störungen des Nucleotidaufbaues im Erythrocyten einhergehen, zumal

die Ausscheidung der Purinbasen im Harn bei diesen Erkrankungen anormal ist (7). Schließlich konnte dort auch eine Reihe methylierter Purinbasen nachgewiesen werden (7) deren Vermehrung beim Rheumatiker möglicherweise eine ähnliche Rolle für die biologische Spezifität spielt wie das Verhältnis von 5-Methylcytosin zu Cytosin bei den Pflanzen (40, 41). Das Vorkommen methylierter Adenin- und Guaninderivate bestimmter Sequenz in den Blutkörperchen könnte die rheumatische Veranlagung erklären helfen.

Wir untersuchten 18 Normalfälle, 16 Patienten mit primär chronischer Polyarthrit und 12 Gichtkranke mit Hilfe der Säulenchromatographie (Dowex-1-Formiat) auf den Gehalt des Vollblutes an Nucleotiden. Hierfür wurden dem nüchternen Patienten 30 ml Blut entnommen und nach der Methode von BISHOP und Mitarbeitern (1) aufgearbeitet. Die Trennung der Blutnucleotide führten wir nach der Methode von HURLBERT und Mitarbeitern durch (42). Für die Umrechnung der Nucleotidkonzentration in μMol pro Liter Blut benützten wir die von BISHOP und Mitarbeitern (1) angegebenen Faktoren.

Abkürzungen

ADP	= Adenosin-5'-diphosphat	HS	= Harnsäure
AMP	= Adenosin-5'-monophosphat	HX	= Hypoxanthin
ATP	= Adenosin-5'-triphosphat	IMP	= Inosin-5'-monophosphat
CDP	= Cytidin-5'-diphosphat	RNA	= Ribonucleinsäure
CTP	= Cytidin-5'-triphosphat	TPN	= Triphosphopyridinnucleotid
de CDP	= Desoxycytidin-5'-diphosphat	UDP	= Uridin-5'-diphosphat
DPN	= Diphosphopyridinnucleotid	UMP	= Uridin-5'-monophosphat
G	= Guanin	UTP	= Uridin-5'-triphosphat
GMP	= Guanosin-5'-monophosphat	XMP	= Xanthin-5'-monophosphat
GTP	= Guanosin-5'-triphosphat		

Methode

Dem nüchternen Patienten wurden 30 ml Blut entnommen und in einem eisgekühlten Becherglas mit 0,6 ml (600 Heparineinheiten) einer Natriumheparinlösung gemischt. Davon wurden 25 ml weiterverarbeitet. Den verbleibenden Rest verwendeten wir für die Bestimmung des Haematokrits. Vollblut besitzt gewisse Nachteile gegenüber gewaschenen Erythrocyten. So enthält das Plasma selbst Substanzen, die im UV absorbieren, wodurch der Nucleotidgehalt der roten Blutkörperchen allein nicht exakt erfaßt werden kann (43, 44). Außerdem weisen die weißen Blutkörperchen einen anderen Nucleotidgehalt auf als die roten. Sie besitzen z. B. unterschiedlich zu ihnen CTP und UTP (45). Trotzdem entschlossen wir uns in diesem Falle, wo es weniger auf die Untersuchung der Erythrocyten, sondern auf die Feststellung von Veränderungen bei rheumatischen Erkrankungen ankommt,

Vollblut zu verwenden, um das leicht vulnerable Nucleotidmuster zu schonen. Zur Vermeidung von Leukozytosen wurde nur Nüchternblut entnommen.

Die 25 ml heparinisierten Blutes versetzten wir mit 25 ml eiskühler 10-proz. Trichloressigsäure und rührten 20 Min. lang kräftig im Wasserbad bei + 4°. Anschließend wurde zentrifugiert und das Überstehende bei + 4° aufbewahrt. Diesen Vorgang wiederholten wir noch 2 mal mit 5-proz. Trichloressigsäure. Die vereinigten Überstände wurden mit gleichen Volumina kalten Äthers bis zur neutralen Reaktion extrahiert, anschließend mit Stickstoff bis zur Ätherfreiheit durchperlt und im Tiefkühlfach aufbewahrt.

Für die Trennung der Nucleotide verwendeten wir 10 mm × 200 mm Säulen von Dowex-1-Formiat, das durch Waschen mit 50-proz. Ameisensäure hergestellt worden war. Nachdem wir den Trichloressigsäureextrakt des Blutes auf die Säule gebracht hatten, spülten wir solange mit Aqua dest. nach, bis keine UV-Absorption im Durchfluß mehr nachgewiesen werden konnte (1–2 Stunden). Anschließend wurde mit 150 ml 0,13 *n* HCOOH, 75 ml 0,5 *n* HCOOH, 125 ml 2,5 *n* HCOOH, 210 ml 2,5 *n* HCOOH + 0,1 *m* HCOONH₄, 550 ml 4 *n* HCOOH + 0,2 *m* HCOONH₄, 100 ml 4 *n* HCOOH + 0,6 *m* HCOONH₄ und 125 ml 4 *n* HCOOH + 0,8 *m* HCOONH₄ eluiert. Die Fraktionen wurden in 5 ml Portionen mit einer Durchflußgeschwindigkeit von 10–15 ml/Std. gesammelt („Radirac“, LKB, automatischer Fraktionssammler). Nach Bestimmung der Extinktionswerte mit Hilfe des automatisch registrierenden Zeiss Spektralphotometers RPQ 20 A bei 260 *mμ* unter Verwendung der jeweiligen Elutionsflüssigkeit als Standard berechneten wir die μ Mol pro Liter Blut, indem wir die Summe der Extinktionen jedes Gipfels mit folgenden Faktoren für die einzelnen Nucleotide multiplizierten und durch 2,5 dividierten: DPN 27, Harnsäure 129, AMP 34,4, TPN 27, ADP 34,5, ATP 35, GTP 42,4 (1, 46). Außer-

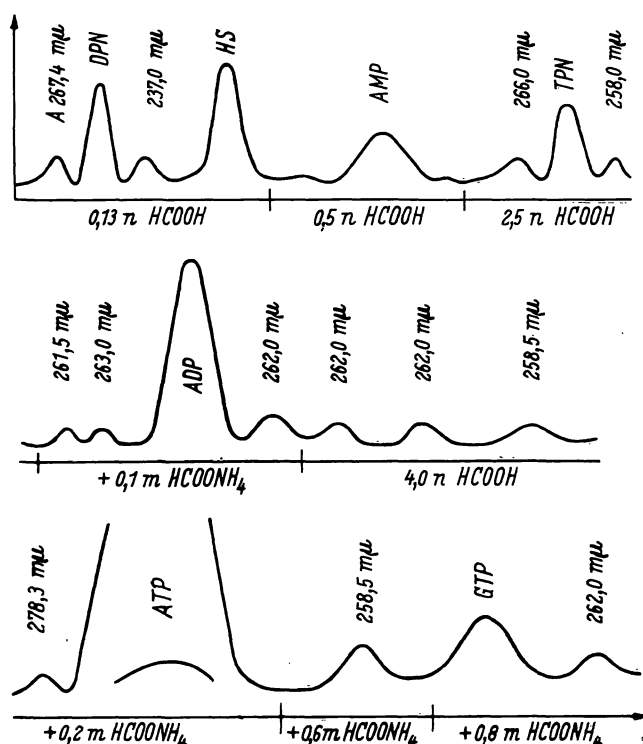


Abb. 1

Säulenchromatographie von 25 ml heparinisiertem Vollblut einer 38-jährigen Patientin mit primär chronischer Polyarthrit auf einer Dowex-1-Formiat-Säule (15 mm Durchmesser, 400 mm Höhe) mit stufenweise steigenden HCOOH- und HCOONH₄-Konzentrationen bei einer Durchflußgeschwindigkeit 15 ml/Std., 25° Außentemperatur und 5 ml Portionen. Automatische Fraktionssammlung mittels „Radirac“; automatische Registrierung bei 260 *mμ* (Zeiss Spektralphotometer RPQ 20 A)

dem wurden die Absorptionsmaxima des Röhrchens mit höchster Extinktion jedes Gipfels gegen die jeweilige Durchflußlösung als Standard bestimmt. In Abbildung 1 ist eine vollständige Kurve bei einer Patientin mit primär chronischer Polyarthrit dargestellt.

Eindimensionale absteigende Papierchromatographie für Nucleotide

Die jeweiligen Elutionsgipfel (Summe aller Röhrchen) wurden gefriergetrocknet. Bei HCOONH₄-Zusatz verblieb das Ganze unter mehrmaliger neuerlicher Aufnahme in Wasser solange im Hochvakuum, bis das Ammonformiat vollständig in die Kältefalle (CO₂-Eis + Aceton) sublimiert war. Anschließend nahmen wir das Nucleotid in 0,5 ml Aqua dest. auf und ließen es in einem Gemisch von 600 g Ammoniumsulfat in 1 Liter 0,1 *m* Phosphatpuffer pH = 6,8 versetzt mit 20 ml *n*-Propanol auf Whatman-Papier Nr. 1 absteigend laufen. Die Flecken wurden im UV-Licht bei Wellenlänge 255,6 *mμ* sichtbar gemacht, mit Aqua dest. eluiert und die UV-Absorptionskurve geschrieben (s. u.).

Eindimensionale absteigende Papierchromatographie für Purinbasen

Nach Einengung des Elutionsgipfels im Hochvakuum bis zur Trockene (s. o.) wurden die Fraktionen in 0,5 ml konzentrierte Perchlorsäure aufgenommen, zur Hydrolyse 1 Stunde im kochenden Wasserbad belassen und nach Zusatz von KOH bis pH = 7,00, Kühlung und Zentrifugieren das Überstehende bis auf 0,3 ml eingengt, neuerlich zentrifugiert und die klare Lösung für die Papierchromatographie abpipettiert. Für die absteigende Chromatographie verwendeten wir Whatman Nr. 1 Papier auf dem wir jeweils 100 μ l auftrugen und entweder 8 Std. in 0,06 *m* Phosphatpuffer pH = 7 oder 0,1 *m* Boratpuffer pH = 9, oder 15 Std. in einem Gemisch *n*-Butylalkohol–0,6 *m* Ammoniumhydroxyd (6:1) sowie *n*-Butylalkohol–89-proz. Ameisensäure–Wasser (77:11:12) bei 25° wandern ließen. Die beiden letzten Gemische wurden stets frisch zubereitet. Nach Bestimmung der *R_F*-Werte wurden die den einzelnen Purinbasen entsprechenden Flecke von der Butylalkohol-Ammoniumhydroxyd- und Butylalkohol-Ameisensäure-Wasser-Chromatographie ausgeschnitten und unter Verwendung eines gleich großen und am selben Papier in gleicher Höhe befindlichen Standardfleckes über Nacht mit je 2 ml 0,1 *n* HCl (Guanin 1,0 *n* HCl) eluiert. Anschließend engten wir alles bis zur Trockene und Säurefreiheit ein und bestimmten die UV-Absorptionskurve bei pH = 2,1 und pH = 9,0 mit Hilfe des automatisch registrierenden Zeiss Spektralphotometers RPQ 20 A indem wir der Probe und dem Standard gleiche Mengen einer entsprechenden Lösung zusetzten (pH 2,1-Lösung enthaltend: 2,40 Mol HCl, 1,00 Mol Na₂HPO₄ und 0,50 Mol H₃BO₃ pro Liter, verdünnt 1:100; pH 9,0: entsprechend verdünnte NaOH).

Ergebnisse

In Abbildung 1 ist ersichtlich, daß bei Verwendung von 25 ml Vollblut anstatt von 10 ml (1) außer den bekannten Gipfeln DPN, Harnsäure, AMP, TPN, ADP, ATP und GTP noch eine Reihe weiterer vorhanden sind, deren Menge nur einen geringen Bruchteil ausmacht. So findet sich vor DPN ein Gipfel A (λ_{\max} = 267,4 *mμ*), der bei sorgfältiger Analyse CDP-Cholin und andere noch unbekannte Verbindungen ergab (1, 45). Hierzu gehören Adenin, Hypoxanthin, Nicotinsäureamid und verschiedene Cytosinderivate (45). Das Vorkommen von CDP-Cholin, deCDP-Cholin, CDP-Aethanolamin und deCDP-Aethanolamin in menschlichen Erythrocyten ist ja bekannt (48). Zwischen DPN und der Harnsäure erscheint mit großer Regelmäßigkeit ein Gipfel, dessen λ_{\max} in 0,13 *n* HCOOH bei 237 *mμ* liegt. Er dürfte von mehreren Aminosäuren, darunter Glutathion gebildet werden, wie die Ninhydrinfärbung ergibt. Vor TPN kommt eine Verbindung mit λ_{\max} um 266 *mμ* in 2,5 *n* HCOOH,

Tab. 1

Verhalten der bekannten Blutnucleotide und der Harnsäurekonzentration in μMol pro Liter Blut bei 18 Normalfällen, 16 Patienten mit primär chronischer Polyarthrit und 12 Patienten mit Harnsäure-Gicht.

Bei der Mittelwertbildung von GTP bei primär-chronischer Polyarthrit wurden die drei schwersten Fällen berücksichtigt, bei der Streuung jedoch nicht. Als Streuung wurden 25% angenommen; analog der Streuung bei der GTP-Bestimmung der Normalfälle ($\pm 23\%$) und der Harnsäuregichtfälle ($\pm 27\%$)

	DPN	HS	AMP	TPN	ADP	ATP	GTP	AMP, ADP, ATP
NORMAL								
Arithm. Mittel	22,55	176,64	25,96	21,32	127,65	338,41	26,78	488
Streuung um arithm. Mittel	$\pm 8,43$	$\pm 61,0$	$\pm 16,6$	$\pm 4,80$	$\pm 48,2$	$\pm 90,3$	$\pm 6,30$	± 79
kleinster Wert	12,18	89,1	4,54	12,44	88,36	209,62	17,95	359
größter Wert	44,10	318,63	65,61	28,56	253,68	507,20	38,12	662
Durchschnittsw. nach Bishop	30,76	138,71	5,76	10,65	47,38	430,00	25,32	483
PRIMÄR CHRONISCHE POLYARTHRITIS								
Arithm. Mittel	24,43	198,83	25,77	24,97	161,33	428,89	51,49	603
Streuung um arithm. Mittel	$\pm 1,08$	$\pm 68,4$	$\pm 15,4$	$\pm 9,60$	$\pm 33,5$	$\pm 84,6$	± 10	± 68
kleinster Wert	4,96	113,52	8,60	14,29	101,64	312,14	28,56	511
größter Wert	53,34	341,85	70,18	49,56	243,26	587,30	57,12	762
HARNSÄURE-GICHT								
Arithm. Mittel	28,84	344,96	20,81	25,16	142,19	405,15	31,46	557
Streuung um arithm. Mittel	$\pm 10,3$	$\pm 101,0$	$\pm 10,5$	$\pm 3,07$	$\pm 46,4$	$\pm 67,4$	$\pm 8,52$	± 78
kleinster Wert	7,43	159,96	7,31	19,38	91,14	321,90	19,82	451
größter Wert	46,06	546,96	37,79	29,13	237,07	528,28	45,87	702

nach TPN eine solche mit λ_{\max} 258,0 μm . Sie entspricht GMP, das bei Haemolyse in verstärktem Maße dort aufzutreten pflegt. Unmittelbar vor ADP sind stets zwei Gipfel erkenntlich, die ein λ_{\max} von 261,5 μm bzw. 263,0 μm aufweisen. Sie entsprechen nicht IMP (λ_{\max} 247 μm), das im haemolytischen Blut dort vorkommt, sondern dürften mit UMP und XMP identisch sein (45). Die Fraktion „4,0 n HCOOH + 0,2 Mol HCOONH₄“ enthält vor ATP fünf kleine Gipfel, von denen der erste mit λ_{\max} 262,0 μm UDP-Glukose, der zweite und dritte mit λ_{\max} 262,0 μm UDP-Galactose und UDP-N-Acetylglucosamin, der vierte mit λ_{\max} 258,5 μm GDP entsprechen und der fünfte mit λ_{\max} 278,3 μm CTP sein dürfte. Nach ATP ist in der Fraktion „4,0 n HCOOH + 6,0 Mol HCOONH₄“ ein Gipfel mit λ_{\max} 258,5 μm vorhanden, der Adenin enthalten dürfte (1) und nach GTP kommt ein Gipfel mit UTP (λ_{\max} 262,0 μm (49)).

Da sowohl CTP als auch UTP in reifen Erythrocyten nicht vorkommen, muß angenommen werden, daß sie von Leukocyten oder Reticulocyten stammen (45). In Tabelle 1 sind die Untersuchungsergebnisse an 18 Normalfällen, 16 Patienten mit primär chronischer Polyarthrit und 12 Patienten mit Harnsäuregicht veranschaulicht. Daneben sind die Durchschnittswerte der 21 Versuchspersonen von BISHOP und Mitarbeitern (1) dargestellt. Es ist zunächst ersichtlich, daß sich unsere Normalwerte von denjenigen von BISHOP etwas unterscheiden. ATP ist bei uns um etwa 100 $\mu\text{Mol/l}$ geringer als dort. Nimmt man aber die Summe aller Adenosinphosphate, liegt der Unterschied unter 5%. Auch die Summe von DPN und TPN ist annähernd gleich mit unserer. Die Schwankungsbreite ist ähnlich groß. Die Nucleotide der Blutkörperchen unterliegen der gleichen physiologischen Streuung wie die Purinbasen im Harn (7, 50, 51).

Bei Patienten mit primär chronischer Polyarthrit besteht eine signifikante Vermehrung der Adenosinphosphate und von Guanosintriphosphat. Sie dürfte mit der Schwere der Erkrankung weitgehend konform gehen. Die Gichtkranken weisen nur eine Vermehrung der Harnsäure auf. Da unsere bisherigen Untersuchungen

ähnlich wie bei BISHOP und Mitarbeitern (1) keine Unterschiede im Nucleotidgehalt der Erythrocyten beider Geschlechter oder verschiedener Altersgruppen ergaben, verzichteten wir — auch in Anbetracht der geringen Zahl — auf eine weitere Aufgliederung nach diesem Gesichtspunkt. Die in Gipfel A vorhandenen freien Purinbasen Hypoxanthin und Adenin waren, soweit beurteilbar, in allen 3 Gruppen gleich. Insbesondere konnte bei der Gicht mit unterschiedlichem Verhalten des Harnsäurequotienten Erythrocyten/Plasma keine konforme Hypoxanthinverschiebung nachgewiesen werden.

Alle nur mit den Absorptionsmaxima bezeichneten Gipfel waren zu klein und wiesen zu große Schwankungen im Verhältnis zu ihrer Konzentration auf, als daß sie mit den hier geübten Methoden hätten quantitativ erfaßt werden können. — Ebenso gelang es nach Hydrolyse der großen Gipfel und Papierchromatographie ihrer Purinbasen bei den hier verwendeten Mengen nicht, sichere Aufschlüsse über das etwaige Auftreten kleinerer Mengen zusätzlicher methylierter oder anderer Purine zu erhalten.

Diskussion

Durch die hier mitgeteilten Untersuchungen scheint eine Reihe der eingangs erwähnten Fragenkomplexe über den Purinstoffwechsel bei rheumatischen Erkrankungen eine Klärung erfahren zu haben. So ergaben R_F -Werte in verschiedenen Lösungsmittelgemischen für Purine (50), methylierte Harnsäuren (52) und Harnsäureribosid (10) keinen Unterschied zwischen der Harnsäurefraktion aus dem Plasma und derjenigen aus dem Vollblute. Insbesondere konnte aus dem Elutionsgipfel des Vollblutes keine methylierte Harnsäure festgestellt und kein Anhaltspunkt für das Vorliegen eines Harnsäureribosids gefunden werden. Auch die UV-Absorptionskurven beider Harnsäuren verliefen zwischen pH = 2,0 und pH = 12,0 vollkommen identisch. Nach unseren eigenen Untersuchungen an 114 Patienten, bei denen wir in Abhängigkeit vom Krankheitsverlauf die Harnsäure im Serum und Vollblut bestimmten, besteht die Ansicht zu Recht, wonach bei steigender

Harnsäurekonzentration zunächst der Harnsäuregehalt im Plasma gegenüber demjenigen in den Erythrocyten überwiegt und bei fallender Harnsäurekonzentration das Umgekehrte zutrifft. Bei diesen Untersuchungen konnten wir ebenso wie BISHOP (53) feststellen, daß der Harnsäuregehalt im hämolytischen Blut wesentlich geringer ist als im Vollblut. Die Ursache hierfür mag in der Labilität dieser Verbindung in alkalischen Medien liegen, kann aber auch mit der Zerstörung der Zellmembran direkt zusammenhängen, wobei durch bisher noch unbekannte Stoffwechselvorgänge erfahrungsgemäß auch die Bereitschaft für Gichtanfälle und polyarthritische Schübe zunimmt.

Der gesteigerte Zerfall weißer oder roter Blutkörperchen gilt als eine der häufigsten Ursachen der sekundären Gicht (54, 55). Sie kommt bei Polycythaemia vera (56), bei myeloischer Leukämie (57), bei Addisonanämie und bei megaloplastischer Anämie im Gefolge der nicht tropischen Sprue vor (58—60). ZUMOFF (60) glaubt eine Abhängigkeit des Harnsäurestoffwechsels von der Folsäure annehmen zu müssen, da die Gicht bei seinen Patienten trotz Besserung der Anämie durch Behandlung mit rohen Leberextrakten unverändert weiter bestehen blieb. Diese Annahme wird durch weitere Untersuchungen (61, 62) gestützt, wonach die Folsäure die Aktivität der Xanthinoxidase *in vitro* stark hemmt. Außerdem konnte nachgewiesen werden (63), daß im Tierversuch bei Folsäuremangel die Xanthinoxidasekonzentration in Leberhomogenaten ansteigt und man fand (64), daß sich die Harnsäurekonzentration im Blute junger Hühner, die große Glycindosen erhielten, umgekehrt zur Folsäurezufuhr verhielt. Auch bei der Chemotherapie des Krebses (65, 66), die zu Folsäuremangel führen kann, kommt es nicht selten zu vermehrter Produktion und erhöhter Ausscheidung von Harnsäure (67, 68). Während aber bei der Steatorrhoe der Folsäuremangel die megaloplastische Anämie bewirkt (69) und nach den vorhin erwähnten Untersuchungen auch eine erhöhte Harnsäureproduktion hervorrufen kann, die dann zur Auslösung der Gicht führt, zumal auch der Beginn derselben mit dem Auftreten der unbehandelten megaloplastischen Anämie zusammenfällt (54), entwickeln die Patienten mit der Addisonanämie durch Vitamin B₁₂-Mangel ihre Gicht erst, wenn gleichzeitig mit der einsetzenden Vitamin B₁₂-Behandlung und dem Reticulozytenanstieg (UTP und CTP Vermehrung im Vollblut) auch die Harnsäurekonzentration zunimmt. Die endogene Harnsäureproduktion ist vorher gewöhnlich normal (70, 71). Nach experimentellen Untersuchungen (64) hemmt die Folsäure in der Tat die Harnsäuresynthese während sie Vitamin B₁₂ beschleunigt. PATRIDGE und DUTHIE (72), die bei 2544 Patienten mit primär chronischer Polyarthrit in 1,38% eine makrozytäre Anämie fanden (Kontrollgruppe 0,27%) führen diese in der Hauptsache auf einen Antikörper zum Vitamin B₁₂-Intrinsic-Faktor-Komplex zurück, der das Vitamin dem Knochenmark vorenthält (73). Prednisolon wirkt in diesem Falle über die Hemmung der Antigen-Antikörperreaktion auf

die Anämie und verhindert Schleimhaut- und wahrscheinlich auch andere Schäden, die im Verlaufe dieser Reaktion aufzutreten pflegen.

RICHMOND und Mitarbeiter (34) glauben die Ursache der Anämie bei rheumatischen Erkrankungen auf einen schwachen hämolytischen Faktor im Serum zurückführen zu können. Während nämlich die Erythrocyten von Patienten mit primär chronischer Polyarthrit normale Lebensdauer aufweisen, wenn sie in die Blutbahn von normalen Personen transfundiert werden (35, 74) und auch in der eigenen Blutbahn, wenn überhaupt, nur eine geringe Verkürzung der Überlebenszeit aufweisen (75), werden die Erythrocyten von Normalpersonen in der Blutbahn von Rheumatikern wesentlich schneller abgebaut als sonst (36). Hierbei muß in Betracht gezogen werden, daß im Blute von Patienten mit erhöhter Hämolyse neigung wahrscheinlich mehr junge und hämolyse resistente Zellen bestehen als bei normalen Individuen, so daß Erythrocyten des Spenders schneller zerstört werden als die körpereigenen, was geradezu charakteristisch für den extrazellulären Typ der Hämolyse ist.

Die Vermehrung der Adenosinphosphate bei der primär chronischen Polyarthrit verdient insofern Beachtung, als das Nucleotidmuster der reifen Erythrocyten bei allen bisher untersuchten Tierarten konstant gehalten zu werden scheint (76—80). CARLSTRÖM und Mitarbeiter (81—84) konnten außerdem an 144 Patienten mit rheumatischen Erkrankungen in 66% eine beträchtliche Besserung des Krankheitsbildes durch zusätzliche Adenosintriphosphorsäurebehandlung erzielen. Die Autoren glauben allerdings an eine Störung des Kohlehydratstoffwechsels, da sie bei der primär chronischen Polyarthrit signifikante Verminderungen der Zitronensäurekonzentration im Blute fanden, die unter Adenosintriphosphorsäurebehandlung parallel mit der klinischen Besserung anstieg. Die Brenztraubensäurespitze, die bei der Polyarthrit höher als normal ist, fiel hingegen unter ATP-Behandlung ab. Sie glauben eine Wirkung von ATP über die enzymatische Phosphorylierung bei dieser Erkrankung annehmen zu dürfen. Auch Leberschäden, wie sie bei 42% aller Polyarthritiker gefunden werden (85, 86) und durch Störungen des Kohlenhydratstoffwechsels erklärt werden können, lassen sich im Tierversuch durch mangelhaften Abbau der Kohlehydrate erzeugen und sprechen ausgezeichnet auf ATP an (85). ATP stimuliert die Nebennierenrinde (87), wodurch ihm eine gewisse Wirkung auf den Hormonhaushalt zukommt (88, 89). In letzter Zeit (90) wird die Erhöhung des Glutaminsäure/Glutamin Quotienten bei der primär chronischen Polyarthrit auf Hemmung der Amidbildung aus Glutaminsäure durch ATP (91) zurückgeführt, zumal auch GYÖRKI und SANDELL (92) den ATP-Gehalt der Erythrocyten bei primär chronischer Polyarthrit erhöht fanden.

Schließlich kommt es mit der Alterung der Zelle zu einer fortlaufenden Adenosintriphosphatverminderung in ihr. So stellten RAPOPORT und Mitarbeiter (93, 94) fest, daß der Reticulozyt — der unmittelbare Vorläufer

des Erythrocyten — ungefähr 2,5 mal soviel Adenosintriphosphat enthält als der durchschnittliche Erythrocyt im zirkulierenden Blut. Auch LÖHR und Mitarbeiter (95) fanden eine Abnahme des Adenosintriphosphatgehaltes im menschlichen Erythrocyten während seiner Lebenszeit begleitet von einer äquivalenten Zunahme des Adenosindiphosphates. Ebenso ist bekannt, daß beim Altern der Erythrocyten in vitro der Adenin-nucleotidspiegel gleichzeitig mit der Abnahme der Zellfunktionen rapid schwindet (96—98).

Die Adenosinphosphat-Vermehrung in den Blutkörperchen von Patienten mit primär chronischer Polyarthrit könnte somit ein Zeichen für das Vorliegen eines größeren Prozentsatzes jüngerer Erythrocyten im Gefolge der Hämolyse sein. So fand KÖLLE (99) bei dieser Erkrankung eine Hämoglobinreifungsstörung mit Vermehrung der basophilen nicht hämoglobinierten Erythroblasten und eine Störung der Kernreifung mit Vermehrung der $K_{1/2}$ - und $K_{1/4}$ -Erythroblasten und sehr deutliche Verminderung der $K_{1/8}$ -Erythroblasten. Wahrscheinlich stellt sie aber eine Gegenregulation auf die Hemmung fermentativer Stoffwechselprozesse dar und wird auch durch die Cortisonmedikation gefördert, die wohl 1 Woche vor der Blutentnahme abgesetzt wurde, aber möglicherweise gerade auf diesem Stoffwechselgebiet wesentlich länger nachwirkt. So erhöht Cortison sehr schnell den Einbau von Glycin 2- 14 C in säurelösliche Adennucleotide und RNA (100) und verursacht eine beträchtliche Vermehrung des ATP in der Leber von Ratten. Hand in Hand damit gehen anhaltende Verschiebungen des RNA-, Aminosäuregehaltes und Enzymmusters der Leber (100) einher, die sich auch auf den Nucleotidgehalt der roten Blutkörperchen auswirken können. Es sind also für die Klärung der Cortisonwirkung auf die ATP-Konzentration im menschlichen Erythrocyten noch entsprechende Untersuchungen über längere Zeiträume nötig.

Ebenso wie das ATP in einem konstanten Verhältnis zu ADP und AMP steht, verhält es sich mit GTP und dem Di- bzw. Monophosphat. Das Verhältnis von ATP zu ADP soll sogar ziemlich genau demjenigen von GTP zu GDP entsprechen (48). Anscheinend dürften die Phosphatgruppen des ATP und GTP in schnellem Austausch miteinander stehen (101).

Untersuchungen über den Purinstoffwechsel von Kaninchenerythrocyten (16) verschafften insofern weiteren Einblick in unsere Ergebnisse als Hypoxanthin-8- 14 C als gemeinsame Vorstufe für Adenosintriphosphat und Guanosintriphosphat festgestellt werden konnte. Die Radioaktivität beider Nucleotide stieg im gleichen Prozentsatz nach Zusatz dieser Verbindung an. Auch nach subcutanen Injektionen von Glycin 2- 14 C an Kaninchen konnte festgestellt werden, daß die Form der Kurve der spezifischen Aktivität von Guanin aus Guanosintriphosphat gegen die Zeit aufgetragen derjenigen von Adenin aus Adenosintriphosphat in den Erythrocyten vollkommen gleich. In vitro Versuche ergaben allerdings, daß unterschiedlich zum Kaninchen-

reticulozyten (19) eine Purin-Synthese de novo im Kaninchenerythrocyten nicht möglich ist. Erst nach Zusatz von 5-Amino-1-ribosyl-4-imidazol-carboxamid gelang es mit Natrium Formiat- 14 C oder Glycin 2- 14 C nach Bildung der Inosinsäure radioaktives ATP und GTP zu erhalten, wobei letztere Verbindung 10 mal so aktiv war als erstere (17).

Der reife menschliche Erythrocyt vermag wohl ebenfalls unter den gleichen Voraussetzungen Inosinsäure zu bilden (20), aber besitzt kaum mehr die Fähigkeit, diese in die Adenin-Nucleotide zu verwandeln (53). Selbst Adenosin-8- 14 C-Zusatz in vitro beeinflusst ATP nicht, wohl aber nimmt die Radioaktivität von GTP beträchtlich zu. Die spezifische Vorstufe für ATP ist Adenin (20). So konnte festgestellt werden (102), daß bei intravenöser Injektion von 8- 14 C-Adenin vor allem das ATP und RNA-Adenin in ungefähr dem gleichen Prozentsatz radioaktiv beladen werden. Anscheinend wirkt letztere Verbindung als ein Depotbaustein für Nucleotide oder Purine. ATP wiederum liefert sowohl das Adenin vom Diphosphor- als auch vom Triphosphorpyridinnucleotid. Nur sehr wenig vom injizierten Adenin wird in Guanosintriphosphat oder Ribonucleinsäure-Guanin eingebaut.

GTP kann aus Inosin, Hypoxanthin, Xanthin, Guanin, Guanosin und Adenosin gebildet werden (103), wobei Hypoxanthin eine ergiebigere Vorstufe als Guanin ist (53), was auf den Aufbau $HX \rightarrow IMP \rightarrow GMP$ als den physiologischeren gegenüber $G \rightarrow GMP$ hinweist. Da bei in vitro Versuchen mit Zusatz von Guanin-8- 14 C und Guanosin-8- 14 C zu menschlichen Erythrocyten eine beträchtliche Radioaktivität des Hypoxanthin im IMP neben derjenigen von GTP zu beobachten ist, muß auch hier wie beim Kaninchen (18) und bei anderen Tieren (104—106) die Fähigkeit einer reductiven Deaminierung angenommen werden. Auch Adenosin dürfte rasch zu Inosin deaminiert werden (98, 107—109) und der Phosphorylierung zu AMP entgehen. Ein weiterer Abbau des Adenin in den Blutkörperchen bis zur Harnsäure ist nicht möglich, da die Xanthinoxidase fehlt (53, 98, 110—112). Kleine Mengen von Xanthin werden allerdings besonders im hämolysierten Blut auf bisher noch unbekannten Wegen in Harnsäure verwandelt (53). Wegen des Enzymmangels kommt es auch bei diesen Zuständen zu keiner Begleit-Hyperuricämie. Die ATP-Vermehrung bei der Gicht hat mit der gleichzeitigen Harnsäurevermehrung direkt nichts zu tun.

Die Ursache für die Unfähigkeit aus der Inosinsäure Adennucleotide aufzubauen, liegt nach LOWY und Mitarbeitern (20) ebenfalls in einem Enzymmangel (Adenyl-Succin-Synthase oder Adenyl-Succinase oder beides), wobei noch berücksichtigt werden muß, daß GTP das Coenzym für die Umwandlung von IMP zu AMP über Adenylsuccinat (113) im menschlichen Erythrocyten in viel geringeren Mengen als beim Kaninchen vorhanden ist. Möglicherweise bewirkt der GTP-Anstieg bei der primär chronischen Polyarthrit die Zunahme des ATP und ist ersterer mit einer Zu-

nahme vom Amino-imadazol-carboxamid verbunden, das im menschlichen Harn nachgewiesen werden kann (114) und bei rheumatischen Erkrankungen deutlich vermehrt ist. Allerdings können Erythrocyten auch fertige Purine, die in anderen Geweben z. B. in der Leber entstanden sind, aus der Blutbahn aufnehmen und verwerten (115, 116), so daß sowohl die ATP- als auch die GTP-Vermehrung von anderer Stelle ausgehen können.

Eine wichtige Aufgabe, die Bestimmung der Molekulsummen Adenin + methylierte Adeninverbindungen einerseits und Guanin und Methyl-Guanine andererseits (40, 117), konnte wegen Insuffizienz der Untersuchungsmethoden noch nicht in Angriff genommen werden (118). Bisher wurden sie allerdings zum Groß-

teil nur in der „soluble“ und „transfer“ Fraktion der RNA gefunden (119) und haben damit aller Wahrscheinlichkeit nach mit der Proteinsynthese dieser RNA zu tun. Nach LITTLEFIELD und DUNN (120) dürfte z. B. N⁶-Methyladenin am Codieren ungewöhnlicher Aminosäuren, wie z. B. Cystein oder Tryptophan beteiligt sein, was insofern interessant scheint, als sich in letzter Zeit die Berichte über Störungen des Tryptophanstoffwechsels bei der primär chronischen Polyarthrit häufen (121, 122, 123). Auch N²-Methyladenin kann als Bestandteil des dem Vitamin B₁₂ ähnlichen Faktors A (124, 125) eine bedeutende Rolle sowohl bei der Gicht als auch bei der primär chronischen Polyarthrit spielen.

Literatur

1. BISHOP, C., D. M. RANKINE und J. TALBOTT, *J. biol. Chemistry* 234, 11 (1959). — 2. ALBAUM, H. G., T. CAYLE und A. SHAPIRO, *J. Clin. Invest.* 30, 525 (1951). — 3. ROTTINO, A., G. T. HOFFMANN und H. ALBAUM, *Blood* 7, 836 (1952). — 4. GABRIO, B. W., C. A. FINCH und F. M. HUENNEKENS, *Blood* 11, 103 (1956). — 5. WILLOUGHBY, H. W. und H. A. WAISMAN, *Cancer Res.* 17, 942 (1957). — 6. LASSEN, U. V. und K. OVERGAARD-HANSEN, *Biochim. biophysics Acta* (Amsterdam) 57, 111ff. (1962). — 7. SCHMID, J. und R. FINK, *Ztschr. Rheumaforschung* 23, 95 (1964). — 8. OVERGAARD-HANSEN, K. und A. T. NIELSEN, *Scand. J. Clin. Laborat. Invest.* 9, 194 (1957). — 9. FORREST, H. S., D. HATFIELD und J. M. LAGOWSKI, *J. Chem. Soc. (London)*, 963 (1961). — 10. LASTER, L. und A. BLAIR, *J. biol. Chemistry* 238, 3348 (1963). — 11. CARTER, C. E. und J. L. POTTER, *Federat. Proc.* 11, 195 (1952). — 12. HATFIELD, D. und J. B. WYNGAARDEN, *Federat. Proc.* 22, 291 (1963). — 13. LASTER, L. und A. BLAIR, *Federat. Proc.* 17, 261 (1958). — 14. LASTER, L. und A. BLAIR, *J. Clin. Invest.* 37, 909 (1958). — 15. PREISS, J. und P. HANDLER, *J. biol. Chemistry* 225, 759 (1957). — 16. LOWY, B. A., B. RAMOT und I. M. LONDON, *J. biol. Chemistry* 235, 2920 (1960). — 17. LOWY, B. A. und M. K. WILLIAMS, *J. biol. Chemistry* 235, 2924 (1960). — 18. LOWY, B. A., M. K. WILLIAMS und J. M. LONDON, *J. biol. Chemistry* 236, 1439 (1961). — 19. LOWY, B. A., J. L. COOK und J. M. LONDON, *J. biol. Chemistry* 236, 1442 (1961). — 20. LOWY, B. A., M. K. WILLIAMS und I. M. LONDON, *J. biol. Chemistry* 237, 1622 (1962). — 21. FELLINGER, K. und J. SCHMID, *Klinik und Therapie des chron. Gelenkrheumatismus*. S. 228, W. Maudrich, Wien (1954). — 22. ROBINSON, G. L., *Ann. Rheumat. Dis.*, London 3, 207 (1943). — 23. HINTZELMANN, U., *Pro Medico*, Mainz 10, 345 (1949). — 24. PERMANYER, J. J., *Rev. Esp. Rheum.* 2, 262 (1947). — 25. MASETTI, G. P., F. SANGIORGI, G. DANIELI und S. TURA, *Arch. pat. clin. med.* 39, 52 (1962). — 26. EKELOUND, G., *Rheumatism*, London 18, 84 (1962). — 27. LÖVGREN, O., *Acta med. scand. Suppl.* 163 (1945). — 28. HEILMEYER, L. und K. PLÖTNER, *Das Serumeisen und Eisenmangelkrankheit*. Gustav Fischer, Jena (1937). — 29. FERSTL, A. und J. SCHMID, *Wr. Ztschr. f. inn. Med.* 33, Heft 4 (1952). — 30. Bericht über Rheumatologen Kongreß Bad Ragaz 17.—21. Okt. 1962, *Zschr. Rheumaforsch.* 23, 57 (1963). — 31. SINCLAIR, R. J. G. und J. J. DUTHIE, *Brit. Med. J.* 2, 1257 (1950). — 32. ROSS, D. N., *Ann. Rheumat. Dis.*, London 9, 358 (1950). — 33. JEFFREY, M. R., *Blood* 8, 502 (1953). — 34. RICHMOND, J., W. R. M. ALEXANDER, J. L. POTTER und J. J. R. DUTHIE, *Ann. Rheumat. Dis.*, London 20, 133 (1961). — 35. FREIREICH, E. J., J. F. ROSS, T. B. BAYLES, C. P. EMERSON und S. C. FINCH, *Ann. Rheumat. Dis.*, London 13, 365 (1954). — 36. ALEXANDER, W. R. M., L. M. H. ROY, J. RICHMOND und J. J. R. DUTHIE, *Ann. Rheumat. Dis.*, London 15, 12 (1956). — 37. BYWATERS, E. G. L., *Ann. Nestlé* 13, 24 (1958). — 38. BUMM, J., *Ann. Rheumat. Dis.*, London 13, 365 (1954). — 39. MOLLISON, P. L. und J. PATERSON, *J. Clin. Path.* 2, 109 (1949). — 40. CHARGAFF, E., J. N. DAVIDSON, *The nucleic acids*, Vol. I, S. 354. Acad. Press Inc., New York (1955). — 41. SINSHEIMER, R. L., *J. biol. Chemistry* 208, 445 (1954). — 42. HURLBERT, R. B., H. SCHMITZ, A. F. BRUMM und V. R. POTTER, *J. biol. Chemistry* 209, 23 (1954). — 43. WILLOUGHBY, H. W. und H. A. WAISMAN, *Cancer Res.* 17, 942 (1957). — 44. BISHOP, C., D. M. RANKINE und J. H. TALBOTT, *J. biol. Chemistry* 234, 1233 (1959). — 45. SCHWEIGER, H. G., E. SCHWEIGER und H. J. BREMER, *Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem.* 332, 17 und 27 (1963). — 46. BOCK, R. M., N. LING, S. A. MORELL und S. H. LIPTON, *Arch. Biochem. Biophys.* 62, 253 (1956). — 47. MCCREA, P. C., *Lancet* 1, 402 (1957). — 48. MILLS, G. C., *Texas Rep. Biol. Med.* 18, 43 (1960). — 49. SCHMITZ, H., TH. SCHLEIPEN und R. GROSS, *Klin. Wschr.* 40, 13 (1962). — 50. WEISMAN, B., P. A. BROMBERG und A. B. GUTMAN, *J. biol. Chemistry* 224, 407 und 423 (1957). — 51. BOLLARD, B. M., R. H. CULPAN, N. MARKS, H. MCILLWAIN und M. SHEPHERD, *J. Mental Science* 106, 1250 (1960). — 52. JOHNSON, E. A., *Biochem. J.* 51, 133 (1952). — 53. BISHOP, C., *J. biol. Chemistry* 235, 3228 (1960). — 54. LEWIS, J. G., *Ann. Rheumat. Dis.* 21, 284 (1962). — 55. HICKLING, R. A., *Lancet* 1, 57 (1953). — 56. YÜ, T. F., L. R. WASSERMANN, J. D. BENEDICT, E. J. BIEN, A. B. GUTMAN und D. STETTEN jr., *Amer. J. Med.* 15, 845 (1953). — 57. LASTER, L. und A. F. MÜLLER, *Amer. J. Med.* 15, 857 (1953). — 58. TALBOTT, J. H., *Medicine*, Baltimore 38, 173 (1959). — 59. MORLOCK, C. G. und E. F. ROSENBERG, *Ann. Int. Med.* 20, 981 (1944). — 60. ZUMOFF, B., *Amer. J. Med. Sc.* 225, 674 (1953). — 61. KALCKAR, H. M. und H. KLENOW, *J. biol. Chemistry* 172, 349 (1948). — 62. WILLIAMS, J. N. und C. A. ELVEHJEM, *Proc. Soc. exp. Biol. Med.* 71, 303 (1949). — 63. KEITH, C. K., W. J. BROACH, D. WARREN, P. L. DAY und J. R. TOTTER, *J. biol. Chemistry* 176, 1095 (1948). — 64. MACHLIN, L. J., A. H. LANKENAU, C. A. DENTON und H. R. BIRD, *J. Nutrit.* 46, 389 (1952). — 65. BROQUIST, H. P., *J. Amer. chem. Soc.* 78, 6205 (1956). — 66. HIATT, H. H., M. GOLDSTEIN und H. TABOR, *J. Clin. Invest.* 37, 829 (1958). — 67. SANDBERG, A. A., G. E. CARTWRIGHT und M. M. WINTROBE, *Blood* 11, 154 (1956). — 68. LIPSETT, M. B., D. M. BERGENSTAL und J. PLATTEN, *Cancer Res.* 19, 89 (1959). — 69. GIRDWOOD, R. H., *Brit. Med. Bull.* 15, 14 (1959). In: *Advanc. clin. Chem.* 3, 244 (1960), Academic

Press, New York. — 70. RIDDLE, M. C., J. Clin. Invest. 8, 69 (1930). — 71. OPSAHL, R., Acta med. Scand. 102, 611 (1939). — 72. PATRIDGE, R. E. H. und J. J. R. DUTHIE, Brit. Med. J. 1, 89 (1963). — 73. TAYLOR, K. B., Lancet 2, 106 (1959). — 74. FREIREICH, E. J., J. F. ROSS, T. B. BAYLES, C. P. EMERSON und S. C. FINCH, J. Clin. Invest. 36, 1043 (1957). — 75. LEWIS, S. M. und I. H. PORTER, Ann. Rheumat. Dis. 19, 54 (1960). — 76. PABENBERG, K., Klin. Wschr. 39, 522 (1961). — 77. MANDEL, P. und P. CHAMBER, Bull. Soc. Chim. biol. 41, 989 (1959). — 78. SCHWEIGER, H. G., S. RAPAPORT und E. SCHÖLZEL, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 313, 97 (1958). — 79. SCHWEIGER, H. G., Int. Rev. Cytol. 13, 135 (1962). — 80. SCHWEIGER, H. G., H. J. BREMER und E. SCHWEIGER, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 332, 17 (1963). — 81. CARLSTRÖM, B., O. LÖVGREN und B. SJÖRGEN, Ann. Rheumat. Dis. 8, 293 (1949). — 82. CARLSTRÖM, B., O. LÖVGREN und B. SJÖRGEN, Acta Med. Scand. 110, 230 (1942). — 83. CARLSTRÖM, B., O. LÖVGREN und B. SJÖRGEN, Acta Med. Scand. 115, 568 (1943). — 84. CARLSTRÖM, B., O. LÖVGREN und B. SJÖRGEN, Klin. Wschr. 20, 793 (1941). — 85. LEHNINGER, A. L., J. biol. Chemistry 54, 309 (1944). — 86. SCHMID, J., Med. klin. Wschr. f. Klinik u. Praxis 48 (1953) Nr. 36. — 87. VOGT, M., J. Physiol. 108, 45 (1949). — 88. STONER, H. B. und H. N. GREEN, Brit. Exper. Path. 31, 603 (1950). — 89. RUSKIN, S. L., Amer. J. Digest. Dis. 13, 311 (1946). — 90. NETTELBLADT, E. und B. M. SANDELL, Ann. rheum. Dis. London, 22, 269 (1963). — 91. ELLIOT, W. H. und B. M. SANDELL, J. biol. Chemistry 201, 661 (1953). — 92. GYÖRKI, J. und B. M. SANDELL, Nord. med. 62, 1788 (1959). — 93. RAPAPORT, S., G. M. GUEST und M. WING, Proc. Soc. exp. Biol. Med. 57, 344 (1944). — 94. HOFMANN, E. G. G. und S. RAPAPORT, Hoppe-Seyler's Z. physiol. Chem. 304, 157 (1956). — 95. LÖHR, G. W., H. D. WALLER, O. KARGES, B. SCHLEGEL und A. A. MÜLLER, Klin. Wschr. 36, 1008 (1958). — 96. RAPAPORT, S., J. Clin. Invest. 26, 591 (1947). — 97. GABRIO, B. W., D. M. DONOHUE und C. A. FINCH, J. Clin. Invest. 34, 1509 (1955). — 98. JORGENSEN, S., Acta pharmac. tox., K'hrn 13, 102 (1957). — 99. KÖLLE, G., Zschr. Rheumaforsch. 21, 185

(1962). — 100. FEIGELSON, P. H. und M. FEIGELSON, J. biol. Chemistry 238, 1073 (1963). — 101. GERLACH, E., A. FLECKENSTEIN und K. J. FREUNDT, Pflügers Arch. ges. Physiol. Menschen, Tiere, 263, 682 (1957). — 102. BISHOP, C., J. biol. Chemistry 236, 1778 (1961). — 103. ZIMMERMANN, E. E. und B. MAGASANIK, J. biol. Chemistry 239, 293 (1964). — 104. MAGER, J. und B. MAGASANIK, J. biol. Chemistry 235, 1474 (1960). — 105. GUARINO, A. J. und G. YÜREGIER, Biochim. biophysics Acta (Amsterdam) 36, 157 (1959). — 106. BIWAS, B. B. und R. ABRAMS, Arch. Biochem. Biophysics 92, 507 (1961). — 107. LOWY, B. A. und E. R. JAFFE, G. A. VANDERHOFF und I. M. LONDON, J. biol. Chemistry 230, 409 (1958). — 108. CONWAY, E. J. und R. COOKE, Biochem. J. 33, 479 (1939). — 109. MILLIS, G. C. und L. B. SUMMERS, Arch. Biochem. Biophysics 84, 7 (1959). — 110. HUENNEKENS, F. M., E. NURK und B. W. GABRIO, J. biol. Chemistry 227, 971 (1956). — 111. SANDBERG, A., und G. R. LEE, CARTWRIGHT, G. E. und M. M. WINTROBE, J. Clin. Invest. 34, 1823 (1955). — 112. RUBENSTEIN, D. und O. F. DENSTADT, Canad. J. Biochem. Physiol. 34, 927 (1956). — 113. LIEBERMANN, I., J. Amer. chem. Soc. 78, 251 (1956). — 114. BRAUNSTEIN, A. E. und G. I. VILENKINA, Biochimica 23, 887 (1958). — 115. HENDERSON, J. F. und G. A. LE PAGE, J. biol. Chemistry 234, 3219 (1959). — 116. LAJTHA, L. G. und J. R. VANE, Nature (London) 182, 191 (1958). — 117. THEIL, E. C. und ST. ZANNENHOF, J. biol. Chemistry 238, 3058 (1963). — 118. DUNN, D. B. und J. D. SMITH, Biochem. J. 68, 627 (1958). — 119. DUNN, D. B., J. D. SMITH und P. F. SPAHR, J. molecular Biol. 2, 113 (1960). — 120. LITTLEFIELD, J. W. und D. B. DUNN, Biochem. J. 70, 642 (1958). — 121. HADDOX, C. H. jr. und M. S. SASLAW, J. Clin. Invest. 42, 435 (1963). — 122. BETT, J. M., Ann. rheumat. Dis., London 21, 63 (1962). — 123. SPIERA, H., Arthr. Rheum. 6, 364 (1963). — 124. DION, H. W., D. G. CALKINS und J. J. PFIFFNER, J. Amer. chem. Soc. 76, 948 (1954). — 125. BROWN, F. B., J. C. CAIN, D. E. GANT, L. F. J. PARKER und E. L. SMITH, Biochem. J. 59, 82 (1955).

Dozent Dr. med. J. Schmid
Wien XIX, Österreich
Scheibengasse 13

Schnellmethode zur Darstellung von Fettsäuremethylestern für die gaschromatographische Analyse

Von M. DOSS und K. OETTE

Aus dem Physiologisch-Chemischen Institut der Universität Köln (Direktor: Prof. Dr. Dr. h. c. E. Klenk)

(Eingegangen am 13. August 1964)

Für die gaschromatographische Analyse wird eine quantitative Mikromethode beschrieben, die die Herstellung von Methylestern aus Glyceriden, Glycerinphosphatiden und Cholesterinestern durch Umesterung mit Natrium-methylat innerhalb von fünf Minuten gewährleistet.

Micro quantities of methyl esters for gas chromatography can be prepared quantitatively in five minutes from glycerides, glycerophosphatides and cholesterol esters by transesterification with sodium methylate.

Fettsäuren werden im allgemeinen als Methylester gaschromatographisch analysiert, zu deren Darstellung Veresterungs- und Umesterungsmethoden zur Verfügung stehen. Zur Veresterung von freien Fettsäuren sind folgende Verfahren beschrieben worden:

1. Die säure-katalysierte Veresterung mit Methanol-HCl für langkettige (1) und mit 2-Chloräthanol-HCl für kurzkettige Fettsäuren (2).

2. Die Veresterung mit Diazomethan (3).

3. Die Veresterung mit Methanol-Bortrifluorid (4).

Für die Umesterung verwendet man vorwiegend Methanol-HCl (H_2SO_4). Daneben sind alkali-katalysierte Methoden geübt worden (5—9).

Im Rahmen von Untersuchungen an Spingolipoiden (10) zeigte sich, daß esterartig verknüpfte Fettsäuren rasch mit 0,1 n methanolischer NaOH als Methylester